

MÉTODO PARA EL ALMACENAMIENTO Y/O TRANSPORTE DE CULTIVOS CELULARES IN VITRO.

CAMPO DE LA INVENCION

5

La invención se relaciona con la obtención de un método para el almacenamiento y de transporte de cultivos celulares bidimensionales organizados in vitro, así como con la obtención de un kit para el almacenamiento y transporte de dichos cultivos.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15

Los cultivos celulares, homogéneos o no (cocultivos), pueden constituir modelos útiles de algunos procesos genéticos, bioquímicos, metabólicos o fisiológicos que tienen lugar en el organismo vivo. La facilidad de su manipulación permite el análisis de gran número de condiciones antes de realizar los experimentos definitivos en animales o los ensayos clínicos en seres humanos. Los modelos "in vitro" constituyen una herramienta para la validación de nuevas dianas terapéuticas, para la selección de cabezas de serie en sistemas de alto rendimiento, para la definición del mecanismo de acción de nuevas moléculas y, en general, para la investigación biomédica, biotecnológica o cosmética.

20

25

30

En general, todos los modelos basados en cultivos celulares tienen una vida útil limitada. Así, las células en cultivo pasan por diferentes fases de diferenciación, y requieren de manipulación continua para mantener las propiedades que las hacen un modelo adecuado. Por ejemplo, el modelo de barrera gastrointestinal basado en el cultivo confluyente de células Caco-2 requiere 21 días para alcanzar el estado de diferenciación que permite reproducir muchas de las propiedades de la mucosa intestinal (Le Ferrec et al., ATLA 29:649-668, 1999), y su utilidad se prolonga sólo durante una

ventana de unos 3 a 5 días. Las células BC2, utilizadas como modelo de célula hepática, requieren entre tres y cuatro semanas de diferenciación antes de adquirir las propiedades que las hacen un buen modelo, y las condiciones de cultivo posteriores son clave para que respondan a los tratamientos experimentales de forma parecida al hepatocito (MJ Gómez-Lechón, et al., Eur.J. Biochem.268:1448, 2001). Las células de cordón umbilical Huvec, crecidas hasta confluencia, pueden ser inducidas a formar estructuras comparables a los vasos sanguíneos en condiciones experimentales adecuadas, por lo que constituyen un buen modelo de angiogénesis (Vailhe et al., Lab. Invest. 81:439-452, 2001). Sin embargo, el número de divisiones celulares previo al experimento y el estímulo utilizado son críticos para obtener una respuesta adecuada.

Estas limitaciones en la manipulación y generación de los diferentes modelos celulares "in vitro" los hacen de difícil implementación para los usuarios ocasionales, y en general limitan la comercialización de los modelos en su formato final. El problema se agudiza en modelos complejos, en los que las células deben imitar a las barreras naturales del organismo (Rubas et al., J. Pharma. Sci., 85:165-169, 1996; Walter et al., J. Pharma. Sci., 85:1070-1076; Irvine et al., J. Pharma. Sci., 88:28-33, 1999; Gaillard et al., Eur. J. of Pharma. Sci., 12:215-222, 2001); o los cultivos deben realizarse sobre soportes asimétricos, separando dos compartimientos o con una fuerte dependencia en la polarización de los componentes del sistema. En estos casos, a la complejidad del modelo y a sus limitaciones temporales se añaden problemas de tipo mecánico, que hacen que los golpes o las sacudidas puedan invalidar el sistema. Los investigadores pueden acceder a los diferentes componentes del modelo (soporte, medio y aditivos de cultivo y líneas celulares), y posteriormente deben combinarlos en el laboratorio utilizando procesos más o menos laboriosos. En el mejor de los casos el investigador final puede recibir las células ya listas para su uso, pero con limitaciones que prácticamente obligan a realizar los experimentos dentro de

los dos días posteriores a la recepción, e imponen serias restricciones en la distribución del modelo por parte de la compañía que lo comercializa, como por ejemplo In Vitro Technologies. El documento EP 702 081 describe un método para el almacenamiento y transporte de tejidos tridimensionales que consiste en situar dicho tejido tridimensional fijado sobre dos tipos de esponjas en una solución de gelatina, de tal forma que por enfriamiento ésta se gelifica, facilitando así su transporte y almacenamiento.

Existe por tanto en el estado de la técnica la necesidad de disponer de un método para poder suministrar modelos basados en cultivos celulares bidimensionales organizados a punto para ser utilizados y con sus propiedades funcionales intactas de forma que, por un lado, el investigador disponga de margen de maniobra para su utilización y, por otro, la compañía suministradora pueda plantear tiempos de entrega dentro de los márgenes logísticos razonables de la distribución internacional.

El objeto de la presente solicitud consiste en proporcionar un método para el almacenamiento y el transporte de cultivos celulares bidimensionales organizados in vitro que resuelva las necesidades del estado de la técnica mencionadas anteriormente.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1 - Respuesta en un ensayo de migración de células endoteliales HUVEC, estimuladas o no, sin medio de condicionamiento (células que no han sido mantenidas en el medio con gelatina) y con medio de condicionamiento (72 horas después de haber sido mantenidas en el medio con gelatina), medida en unidades de fluorescencia.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La invención proporciona en su aspecto principal un método para el

almacenamiento y/o el transporte de cultivos celulares organizados in vitro que comprende las siguientes etapas:

- a) recubrimiento con una solución de gelatina en el medio de cultivo a una concentración del 1 a 5% de un cultivo celular organizado inmovilizado sobre un soporte asimétrico, comprendiendo dicho cultivo celular células en el estado funcional adecuado,
- b) solidificación a una temperatura de 15 a 25°C de la gelatina adicionada al soporte, y
- c) almacenamiento y/o transporte del cultivo celular a una temperatura de 15 a 25°C, durante un periodo de hasta 96 horas.

La presente solicitud también proporciona en un segundo aspecto de la invención un kit para el almacenamiento y el transporte de cultivos celulares bidimensionales organizados in vitro según el método de la invención que comprende:

- i) un soporte asimétrico, y
- ii) una solución de gelatina en el medio de cultivo a una concentración del 1 al 5%.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La invención proporciona en su aspecto principal un método para el almacenamiento y/o el transporte de cultivos celulares bidimensionales organizados in vitro que comprende las siguientes etapas:

- a) recubrimiento con una solución de gelatina en el medio de cultivo a una concentración del 1 a 5% en peso de un cultivo celular organizado inmovilizado sobre un soporte asimétrico, comprendiendo dicho cultivo celular células en el estado funcional adecuado,
- b) solidificación a una temperatura de 15 a 25°C de la gelatina adicionada al soporte, y
- c) almacenamiento y/o transporte del cultivo celular a una temperatura

de 15 a 25°C, durante un periodo de hasta 96 horas.

En una realización particular, el método de la invención comprende las siguientes etapas adicionales:

- 5 d) licuación de la gelatina,
- e) eliminación de la gelatina y sustitución de la misma por un medio de cultivo, y,
- f) incubación del cultivo.

10 El método de la invención hace posible que durante el almacenamiento y/o transporte del cultivo o modelo celular se mantengan las propiedades fisiológicas de las células y, además, que se protejan las propiedades mecánicas esenciales para el modelo celular.

15 En el contexto de la presente invención se entiende por soporte asimétrico aquellos recipientes que contienen dos compartimentos físicamente separados por una membrana semipermeable encima de la cual se sitúan las células del cultivo. Como soporte asimétrico preferido la presente invención emplea el soporte tipo transwell.

20 Los cultivos celulares bidimensionales de la invención son cultivos organizados como por ejemplo: células Huvec crecidas a confluencia sobre un soporte de colágeno; cultivo confluyente de células Caco-2 diferenciadas; o cualquier otro tipo de células capaz de crecer en monocapas tales como fibroblastos, células tumorales, hepáticas, endoteliales, etc. Así, ejemplos de
25 líneas epiteliales intestinales derivadas de tumores son Caco-2, TC7, HT29 M6; un ejemplo de línea de epitelio de riñón es MDCK; un ejemplo de keratinocitos humanos primarios de piel es HEK; finalmente ejemplos de líneas o cultivos primarios endoteliales son HUVEC, HMEC-1, BBEC, HAEC y BAEC. Preferentemente, el cultivo celular bidimensional organizado de la
30 invención está diferenciado, polarizado y es funcionalmente activo.

Según la presente invención, la solución de gelatina se prepara disolviendo gelatina en el mismo medio de cultivo, que actúa como disolvente. Gracias al empleo del medio de cultivo como disolvente se consigue que el cultivo almacenado y/o transportado según el método de la presente invención garantice al usuario la preservación de las propiedades funcionales del cultivo y una utilización inmediata. Preferiblemente la solución de gelatina empleada es del 2.5% en peso.

En el método de la invención se puede emplear cualquier gelatina comercial, como por ejemplo gelatina tipo A de piel de cerdo. Similarmente, también se puede emplear cualquier medio de cultivo comercial, como un medio DMEM (1 g/L glucosa). Es "aconsejable" preparar la solución de gelatina con un máximo de 7 días antes de aplicarla al cultivo, ya que de lo contrario ésta pierde parte de sus propiedades de "conservación", las cuales son necesarias para el buen funcionamiento de la presente invención.

La solución de gelatina en el medio de cultivo puede ser suplementada con suero bovino fetal (FBS 10%) y Penicilina/Streptomycin/L-Glutamina (medio de cultivo completo).

El cultivo celular puede prepararse del siguiente modo: realizar primeramente, antes de sembrar las células, un *coating* que implica: 1) colocar los insertos o *transwells* encima de los pocillos de tamaño correspondiente; 2) aplicar sobre la cara superior de los filtros (membranas semipermeables) de cada inserto una solución de colágeno (u otro componente de matriz extracelular, dependiente del tipo celular) en medio de cultivo DMEM (1g/L glucosa) sin suero (u otro medio comercial); y 3) dejar preferiblemente a 37°C en la estufa para cultivos celulares (90% humedad, 5% CO₂). Antes de la utilización del inserto, se aspira el exceso de solución de *coating* de la cara apical, se deja aproximadamente de 15 a 30 minutos en la estufa para cultivos, y se siembran las células correspondientes a la densidad determinada para cada tipo celular y para cada tipo de ensayo. Se

5 mantiene el cultivo durante el tiempo necesario al alcance del estado funcional del sistema, con cambios de medio preferiblemente cada 48–72 horas si necesario. Las características de los insertos o *transwells* utilizados (tamaño, diámetro de poros, material) vienen determinadas de manera específica por el tipo celular y el ensayo al cual se puede aplicar la presente invención. En función del tipo de célula empleada en el cultivo y del tipo de ensayo, tras un número de días transcurridos, se realizan controles para determinar el estado funcional del sistema celular. Por ejemplo, en el caso de los sistemas celulares que se utilizan como modelos de barreras, se pueden emplear medida de TEER (Resistencia Eléctrica TransEpitelial) y permeabilidad paracelular. En el caso de los sistemas celulares que se utilizan para ensayos de migración/invasión, se realiza una determinación de la capacidad de migración/invasión mediante marcaje con un fluorocromo (por ejemplo, calceína) de las células que hayan migrado a la parte inferior del filtro y posterior cuantificación por fluorimetría.

20 Según la presente invención, el cultivo celular se recubre con una solución de gelatina en el medio de cultivo a una concentración de 1 a 5%. De forma general, se aplicará la gelatina en el preciso momento en que se haya comprobado que el sistema celular acaba de alcanzar el estado funcional adecuado, de manera que se inmoviliza el sistema celular ya funcional, pero se deja al usuario un margen de tiempo para hacer sus ensayos al recibir el sistema. Al tiempo de cultivo transcurrido se denomina “tiempo de vida”. De aquí la aplicación de la presente invención a sistemas celulares “*ready-to-use*”. Los tiempos de vida de los cultivos celulares, es decir el tiempo de vida del cultivo en que se aplica la gelatina, dependen no sólo de los tipos celulares del cultivo (fibroblastos, líneas tumorales, etc.) sino también de su aplicación funcional (ensayo de paso de barrera, ensayo de adhesión, ensayo de migración, ensayo de invasión). Su determinación es una cuestión de práctica experimental. Así, en el caso específico de los fibroblastos y células HUVEC sembradas en soportes tipo *transwell* y en

condiciones bajo las cuales estas células estén funcionalmente activas para un ensayo de migración, el tiempo de vida será entre 30 minutos y 1 hora después de sembrar las células. En el caso de un ensayo de invasión, el tiempo será entre 1 y 24 horas. En cambio, en el caso de las células Caco-2 sembradas en *transwells*, el tiempo de vida será 13 días después de sembrar las células, tiempo a partir del cual ya son funcionales como barrera y se aplica la gelatina, dejando al usuario hasta el día 25 de cultivo para realizar el ensayo de paso de barrera.

En el contexto de la presente invención se entiende por *estado funcional adecuado*, el estado que presentan las células viables del cultivo cuando son capaces de realizar la función que tienen asignada en el ensayo.

Para efectuar la aplicación de la gelatina sobre el cultivo en primer lugar es necesario licuar completamente la solución de gelatina, y equilibrarla a la temperatura del cultivo, en general 37°C. A continuación, se retira el medio de cultivo de los 2 compartimentos de cada inserto y se lava el cultivo con medio de cultivo en los 2 compartimentos de cada inserto. Posteriormente se aplica gelatina 2,5% líquida en el compartimiento apical y en el compartimiento basal, y se deja solidificar entre 2 y 3 horas en la campana de flujo y a temperatura ambiente (20-25°C). Una vez ha solidificado la gelatina, se sellan las placas con parafilm y se mantienen a temperatura ambiente hasta su utilización (máximo 4 días después).

En el momento en que se quiera utilizar el cultivo inmovilizado, se incuba la placa con gelatina sólida dentro de un incubador de células hasta la completa licuación de la gelatina, preferiblemente a 37°C, 90% humedad y 5% CO₂ durante 3 a 4 horas hasta la completa licuación de la gelatina. A continuación se elimina de ambos compartimentos mediante aspiración y se lava el cultivo con medio de cultivo equilibrado a 37°C. Posteriormente se aplica el medio de cultivo específico para las células en cuestión y se

incuban estas últimas preferiblemente a 37°C en 90% humedad / 5% CO₂ hasta su uso.

La presente solicitud proporciona en un segundo aspecto de la invención un kit para el almacenamiento y el transporte de cultivos celulares bidimensionales organizados in vitro según el método de la invención que comprende:

i) un soporte asimétrico, y

ii) una solución de gelatina en el medio de cultivo a una concentración del 1 al 5%.

En una realización particular, el kit de la presente invención emplea como soporte asimétrico un soporte tipo *transwell*.

Los ejemplos que se describen a continuación sirven para ilustrar la invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Método para el almacenamiento y transporte del modelo Caco-2 de barrera intestinal in vitro.

1- Preparación de la gelatina

Se utiliza gelatina tipo A de piel de cerdo, disuelta en medio de cultivo DMEM (1g/L glucosa) a 50°C y directamente a la concentración de uso (máxima concentración que se puede disolver: 10%). En el presente caso, se pesan 2,5g de gelatina en polvo y se disuelve con 100 ml de medio de cultivo DMEM (1g/L glucosa). Se esteriliza en seguida (en "caliente") mediante filtración por filtros de 0,22µm de poro. A continuación se suplementa con suero bovino fetal (FBS 10%) y Penicilina/Streptomycin/L-Glutamina (medio de cultivo completo). Finalmente se guarda a 4°C hasta su

utilización.

2- Preparación del cultivo Caco-2 polarizado.

Coating: 12 horas antes de sembrar las células, se colocan los insertos (transwells de 6,5mm de diámetro) encima de los pocillos de tamaño correspondiente, y se aplica sobre la cara superior de los filtros de policarbonato (membranas semipermeables de 0,4µm de diámetro de poro) de cada inserto una solución de colágeno tipo I de cola de rata (20 µg/ml) en medio de cultivo DMEM (1g/L glucosa) sin suero, y se deja a 37°C en la estufa para cultivos celulares (90% humedad, 5% CO₂). Antes de su utilización, se aspira el exceso de solución de *coating* de la cara apical, se deja de 15 a 30 minutos en la estufa para cultivos, y se siembran las células Caco-2 a una densidad de 5×10^5 células/cm². Se mantiene el cultivo durante 13 días, con cambios de medio cada 48–72 horas, poniendo 300µl de medio de cultivo completo en el compartimento apical y 900µl en el basal. Al día 13, se realizan los controles de estado de barrera (polarización) de la monocapa Caco-2 mediante medida de TEER (Resistencia Eléctrica TransEpitelial) y permeabilidad paracelular. Estos controles permiten determinar el estado funcional del sistema celular como barrera antes de recubrir con gelatina.

3- Aplicación de la gelatina

Se pone en un baño de cultivo a 37°C hasta su completa licuación y se equilibra a la temperatura del cultivo (37°C). A continuación, se retira el medio de cultivo de los 2 compartimentos de cada inserto y se lava el cultivo con medio de cultivo completo en los 2 compartimentos de cada inserto. Posteriormente se aplica 300µl de gelatina 2,5% líquida en el compartimento apical y 900µl en el compartimento basal, y se deja solidificar entre 2 y 3 horas en la campana de flujo y a temperatura ambiente (20-25°C). Una vez ha solidificado la gelatina, se sellan las placas con parafilm y se mantienen a temperatura ambiente hasta su utilización.

(máximo 4 días después).

4- Eliminación de la gelatina

5 En el momento en que se quiera utilizar el cultivo inmovilizado, se incuba la placa con gelatina sólida dentro de un incubador de células a 37°C, 90% humedad y 5% CO₂ durante 3 a 4 horas hasta la completa licuación de la gelatina. A continuación se elimina de ambos compartimentos mediante aspiración y se lava el cultivo con medio de cultivo completo equilibrado a 37°C. Posteriormente se aplica el medio de cultivo específico para células 10 Caco-2 y se incuban las células a 37°C en 90% humedad / 5% CO₂ hasta su uso (mínimo 24 horas; máximo 9 días después), cambiando el medio cada 48-72 horas.

Tabla I: Estabilidad del estado funcional de barrera del sistema celular Caco-2 almacenado en gelatina 2,5% a temperatura ambiente, evaluado mediante medida de TEER (valores en ohm x cm²).

TIEMPO INMOVILIZACIÓN EN GELATINA					
	1 DIA	3 DIAS	4 DIAS	5 DIAS	7 DIAS
ANTES	3637,81 ± 93,34	3027,97 ± 154,55	4949,01 ± 140,90	4855,51 ± 5,5	4855,51 ± 5,5
TIEMPO 3 DIAS	3451,89 ± 541,30	3117,73 ± 13,10	3528,51 ± 198,45	1743,17 ± 63,29	882,97 ± 563,3
DESPUES 5 DIAS	3434,53 ± 5,81	3143,03 ± 178,6	ND	ND	ND
GELATINA 9 DIAS	4110,15 ± 503,74	3318,15 ± 267,4	ND	ND	ND

(ND: No Determinado)

Tal y como se presenta en la Tabla I, solo se observa una disminución significativa en los valores de TEER obtenidos después de 5 y 7 días de inmovilización en gelatina comparando con los valores controles obtenidos antes de aplicarla. Este resultado indica que el método de almacenamiento en gelatina descrito en esta invención permite: 1) inmovilizar el sistema Caco-2 hasta 4 días a temperatura ambiente sin afectar su estado funcional de barrera; y 2) una vez quitada la gelatina, mantener hasta 9 días después su estado funcional para realizar ensayos de paso de barrera.

Ejemplo 2: Características de los cultivos y determinación de los tiempos de vida del cultivo antes de aplicar la gelatina.

En la Tabla II se indican algunos de los tipos celulares cultivables en soportes tipo *transwells* que forman monocapas y que son susceptibles de ser almacenables y transportables en gelatina en su estado de barrera y, por tanto, cultivos a los cuales es aplicable el presente método de transporte.

- Caco-2, TC7, HT29 M6: líneas epiteliales intestinales derivadas de tumores,
- MDCK: línea de epitelio de riñón,
- HEK: keratinocitos humanos primarios de piel,
- HUVEC, HMEC-1, BBEC, HAEC, BAEC: líneas o cultivos primarios de células endoteliales.

Tabla II: Densidades celulares recomendadas para la siembra en insertos y tiempos de cultivo para la obtención de sistemas de barreras in vitro.

Tipo Celular	Densidad células/cm ²	Tiempo de cultivo	Tipo de inserto recomendado	Tiempo de vida en aplicar gelatina
Caco-2	5 X 10 ⁵	21-25 días	6.5mm (poro 0,4µm)	13-14 días
TC7	6 X 10 ⁴	21-25 días	6.5mm (poro 0,4µm)	13-14 días
HT29-M6	5 X 10 ⁵	21-25 días	6.5mm (poro 0,4µm)	13-14 días
MDCK	8 X 10 ⁴	6 – 8 días	12mm (poro 0,4µm)	ND
HEK	5 X 10 ⁵	7-8 días	12mm (poro 0,4µm)	ND
HUVEC	6 – 7 X 10 ⁴	6-7 días	12mm (poro 0,4 µm)	ND
HMEC-1	6 – 7 X 10 ⁴	6-7 días	12mm (poro 0,4 µm)	ND
BBEC	2,5 X 10 ⁴	11-13 días (con astrocitos)	24mm (poro 0,4µm)	ND

(ND: No Determinado)

Los tiempos de cultivo indicados en la Tabla II se refieren al intervalo de tiempo óptimo de obtención de una monocapa polarizada, más allá del cual pierde sus propiedades funcionales óptimas como barrera celular.

La determinación de los tiempos de vida (momento del cultivo en que se aplica la gelatina) de estos sistemas celulares, que permitan a la vez preservar su estado funcional de barrera y dejar tiempo al usuario para realizar el ensayo, se ha efectuado de modo experimental mediante medida de TEER y permeabilidad paracelular.

La gelatina se aplica al cultivo en el momento en que éste alcanza el estado funcional adecuado. En el caso del ensayo de paso de barrera de células Caco-2, la gelatina se aplica preferiblemente a día 13 (tiempo mínimo aproximado en el cual las células empiezan a formar una monocapa polarizada funcional o barrera). Se pueden mantener en gelatina hasta aproximadamente el día 17 a temperatura ambiente y utilizarse hasta aproximadamente día 25, sin perder sus propiedades funcionales de barrera.

Los tiempos de vida bien de otros tipos celulares (fibroblastos, líneas tumorales), o bien de estos mismos descritos en la Tabla II pero definidos para otras aplicaciones funcionales diferentes del ensayo de paso de barrera (ensayo de adhesión, ensayo de migración, ensayo de invasión), representan diferentes tiempos de aplicación de la gelatina. Así, en el caso específico de los fibroblastos y células HUVEC sembradas en soportes tipo *transwell* y en condiciones bajo las cuales estas células estén funcionalmente activas para un ensayo de migración, el tiempo de vida será entre 30 minutos y 1 hora después de sembrar las células. En el caso de un ensayo de invasión el tiempo será entre 1 y 24 horas.

Ejemplo 3: Método para el almacenamiento y transporte de sistemas

celulares para los ensayos de migración/invasión “ready to use”.**1- Preparación de la gelatina**

Se utiliza gelatina tipo A de piel de cerdo, disuelta en el medio de cultivo correspondiente del tipo celular que va a ser usado (por ejemplo, DMEM (1g/L glucosa) en el caso de los fibroblastos o medio EBM en el caso de las células endoteliales HUVEC) a 50°C y directamente a la concentración de uso (máxima concentración que se puede disolver: 10%). En el presente caso, se pesan 2,5g de gelatina en polvo y se disuelve con 100 ml de medio de cultivo. Para aumentar la supervivencia celular durante el almacenamiento y transporte, se añade HEPES 25mM al medio de condicionamiento. Se esteriliza en seguida (en “caliente”) mediante filtración por filtros de 0,22µm de poro. A continuación, se suplementa con suero bovino fetal (porcentaje en función del tipo celular) y Penicilina/Streptomycin/L-Glutamina (medio de cultivo completo). Finalmente se guarda a 4°C hasta su utilización.

2- Preparación del cultivo celular en el soporte asimétrico.

En caso de recubrimiento, 12 horas antes de sembrar las células, se colocan los insertos (sistema *Fluoroblock* de 3 o 8 µm de diámetro) encima de los pocillos de tamaño correspondiente, se aplica sobre la cara superior e inferior de los filtros de cada inserto una solución de la matriz correspondiente (colágeno, fibronectina, vitronectina etc.) diluida en PBS, y se deja a 37°C en la estufa para cultivos celulares (90% humedad, 5% CO₂). Antes de su utilización, se aspira el exceso de solución de recubrimiento de la cara apical, se deja de 15 a 30 minutos en la estufa para cultivos, y se siembran las células a una densidad que depende del tipo celular (entre 5 x 10⁴ y 1 x 10⁵ células/cm²). Si el soporte asimétrico no se recubre con matriz, las células se siembran directamente sobre el filtro. En este tipo de ensayo, durante el período de siembra y adhesión de las células (entre 30 minutos y 1 hora), no es necesario poner medio en el compartimiento basal del sistema

Fluoroblock. Se realiza el ensayo correspondiente con una parte de las células sembradas, mientras que al resto se les aplica la gelatina para su mantenimiento a temperatura ambiente. Estos controles permiten determinar el estado funcional del sistema celular.

5

3- Aplicación de la gelatina

La solución de gelatina se pone en un baño de cultivo a 37°C hasta su completa licuación y se equilibra a la temperatura del cultivo (37°C). A continuación, se retira el medio de cultivo del compartimiento apical de cada inserto y se lava con medio de cultivo (sin suero en este caso). Posteriormente se aplica 300µl de gelatina 2,5% líquida en el compartimiento apical y se deja solidificar entre 2 y 3 horas en la campana de flujo. A continuación se añaden 700µl en el compartimiento basal, y una vez solidificada en la campana de flujo, se guarda a temperatura ambiente (20-25°C). Una vez ha solidificado la gelatina, se sellan las placas con parafilm y se mantienen a temperatura ambiente hasta su utilización (máximo 4 días después).

10

15

4- Eliminación de la gelatina

20

25

En el momento en que se quiera utilizar el cultivo inmovilizado, se incuba la placa con gelatina sólida dentro de un incubador de células a 37°C, 90% humedad y 5% CO₂ durante 3 a 4 horas hasta la completa licuación de la gelatina. A continuación se elimina de ambos compartimientos mediante aspiración y se lava el cultivo con medio de cultivo sin suero equilibrado a 37°C. En este momento el cultivo está preparado para la realización del ensayo de migración/invasión.

30

En el ensayo de migración (24 h de migración) se compara la respuesta de células HUVEC que no han sido mantenidas en medio de condicionamiento (sin medio de condicionamiento) con la respuesta de células HUVEC mantenidas durante 72 horas con medio de condicionamiento. En ambos

casos las células han sido estimuladas (control +) con medio EBM completo (con factores de crecimiento y el 10% de suero bovino fetal). Las células no estimuladas (control -) se han mantenido con EBM sin suplemento en la parte basal.

5

Tal y como se presenta en la Figura 1, las células mantenidas en gelatina son capaces de responder a un estímulo migratorio (control + en la figura). Este resultado indica que el método de almacenamiento en gelatina descrito en esta invención permite: 1) inmovilizar el sistema HUVEC hasta 3 días a temperatura ambiente sin afectar su estado funcional; y 2) una vez quitada la gelatina, se puede realizar un ensayo de migración.

10

REIVINDICACIONES

1. Método para el almacenamiento y el transporte in vitro de cultivos celulares bidimensionales organizados que comprende las siguientes etapas:

a) recubrimiento con una solución de gelatina en el medio de cultivo a una concentración del 1 a 5% de un cultivo celular organizado inmovilizado sobre un soporte asimétrico, comprendiendo dicho cultivo celular células en el estado funcional adecuado,

b) solidificación a una temperatura de 15 a 25°C de la gelatina adicionada al soporte, y

c) almacenamiento y/o transporte del cultivo celular a una temperatura de 15 a 25°C, durante un periodo de hasta 96 horas.

2. Método según la reivindicación 1 que comprende las etapas adicionales:

a) licuación de la gelatina,

b) eliminación de la gelatina y sustitución de la misma por un medio de cultivo, y

c) incubación del cultivo.

3. Método según las reivindicaciones anteriores caracterizado porque el cultivo celular bidimensional organizado está diferenciado, polarizado y es funcionalmente activo.

4. Método según la reivindicación 3 caracterizado porque el cultivo celular está seleccionado de entre: células Huvec crecidas a confluencia sobre un soporte de colágeno y células Caco-2 diferenciadas, o cualquier otro tipo de células capaz de crecer en monocapas tales como fibroblastos, células tumorales, hepáticas, endoteliales, etc.

5. Método según las reivindicaciones anteriores caracterizado porque la

solución de gelatina empleada es del 2.5%

5 6. Método según las reivindicaciones anteriores caracterizado porque la gelatina se solidifica a una temperatura de 15 a 25°C, durante un periodo de 30 minutos a 12 horas.

7. Método según las reivindicaciones anteriores caracterizado porque el soporte asimétrico es un soporte tipo transwell.

10 8. Método según las reivindicaciones anteriores caracterizado porque la licuación de la gelatina se efectúa entre 35 y 40°C durante un periodo de 1 a 4 horas.

15 9. Método según la reivindicación 8 caracterizado porque la licuación de la gelatina se efectúa a 37°C.

20 10. Método según las reivindicaciones anteriores caracterizado porque la incubación posterior del cultivo se efectúa entre 35 y 40°C durante un periodo de 1 hora a 8 días.

11. Método según la reivindicación 10 caracterizado porque la incubación posterior del cultivo se efectúa a 37°C.

25 12. Kit para el almacenamiento y/o el transporte in viro de cultivos celulares bidimensionales organizados según el método de cualquiera de las reivindicaciones 1-11 que comprende:

i) un soporte asimétrico, y

ii) una solución de gelatina en el medio de cultivo a una concentración del 1 al 5%.

30 13. Kit según la reivindicación 12 caracterizado porque el soporte asimétrico

es un soporte tipo transwell.

Ensayo de migración de células HUVEC (24h de migración)

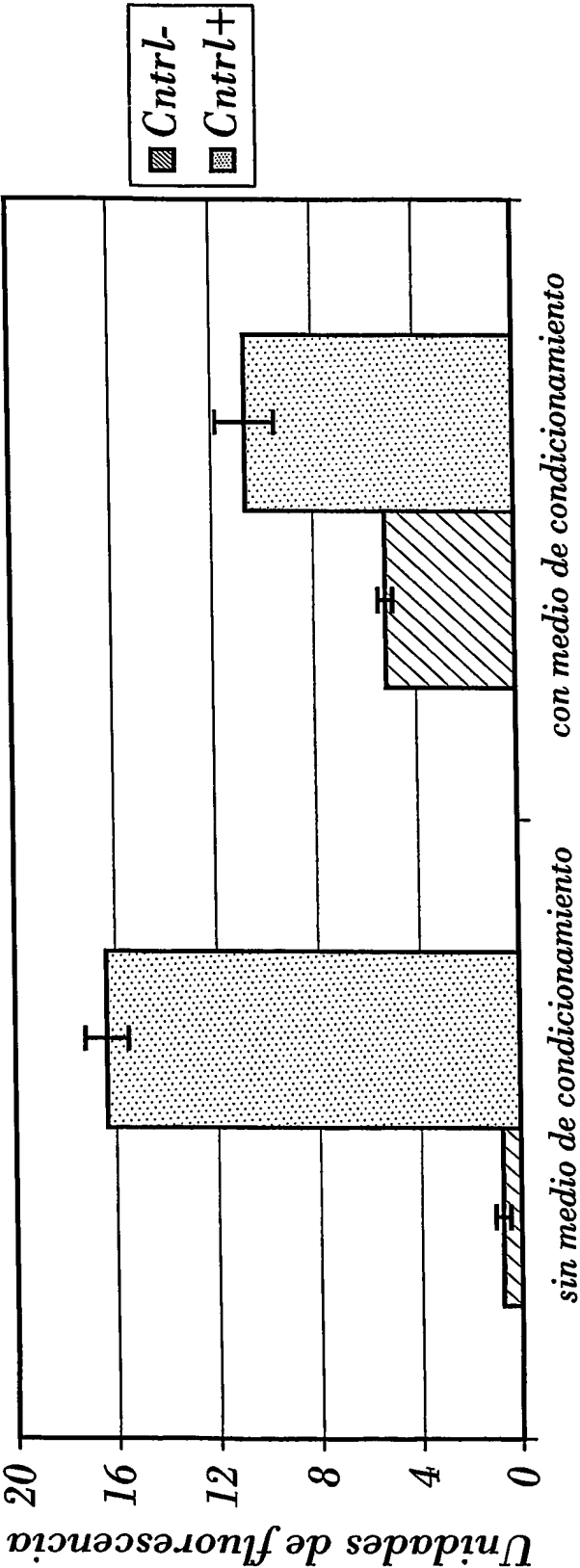


FIG. 1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ ES 2004/000140

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CIBEPAT, EPODOC, WPI, BIOSIS, CA

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP.0702081 A2 (GUNZE LIMITED) 20.03.1996, the whole document	1-13
A	US 6194138 B1 (ZANDER, R.) 27.02.2001, the whole document	1,2,5,6,8-11
A	WO 02/074301 A1 (UNIVERSITY OF PITTSBURGH OF THE COMMONWEALTH SYSTEM OF HIGHER EDUCATION et al.) 26.09.2002, page 22, lines 2 to 7	4,7,13
A	EP 1127580 A2 (PFIZER PRODUCTS INC.) 29.08.2001, page 9, lines 16 and 17	4
A	WO 01/66783 A1 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY) 13.09.2001, page 20, lines 4 to 8	1

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 june 2004 (16.06.04)

Date of mailing of the international search report

01 JUL 2004**01.07.2004**

Name and mailing address of the ISA/

S.P.T.O.

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

International application No.

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

1981

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/ ES 2004/000140

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0702081 A	20.03.1996	EP 19950114741 JP 8089239 A JP 2858087 B US 6051425 A US 6300128 B EP 1361265 A EP 20030015613	19.09.1995 09.04.1996 17.02.1999 18.04.2000 09.10.2001 12.11.2003 19.09.1995
US 6194138 B	27.02.2001	DE 19735460 A EP 0898889 AB EP 19980114288 JP 11116490 A AT 252826 T DE 59810005 D PT 898889 T ES 2205342 T	18.02.1999 03.03.1999 30.07.1998 27.04.1999 15.11.2003 04.12.2003 31.03.2004 01.05.2004
WO 02074301 A	26.09.2002	CA 2440480 A EP 1379230 A EP 20020725226	26.09.2002 14.01.2004 15.03.2002
EP 1127580 A	29.08.2001	CA 2337616 A EP 20010301510 AU 2317201 A JP 2001261564 A US 2002009433 A HU 0100844 A ZA 200101488 A US 2004091527 A	23.08.2001 20.02.2001 30.08.2001 26.09.2001 24.01.2002 28.03.2002 21.08.2002 13.05.2004
WO 0166783 A	13.09.2001	AU 4122901 A KR 2001087681 A US 2003073735 A	17.09.2001 21.09.2001 17.04.2003
SU1822876 A	23.06.1993	NONE	

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°
PCT/ ES 2004/000140

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

CIP⁷ C12N5/00

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)
CIP⁷ C12N

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

CIBEPAT, EPODOC, WPI, BIOSIS, CA

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
X	EP.0702081 A2 (GUNZE LIMITED) 20.03.1996, todo el documento.	1-13
A	US 6194138 B1 (ZANDER, R.) 27.02.2001, todo el documento.	1,2,5,6,8-11
A	WO 02/074301 A1 (UNIVERSITY OF PITTSBURGH OF THE COMMONWEALTH SYSTEM OF HIGHER EDUCATION et al.) 26.09.2002, pág. 22, líneas 2 a 7.	4,7,13
A	EP 1127580 A2 (PFIZER PRODUCTS INC.) 29.08.2001, pág. 9, líneas 16 y 17.	4
A	WO 01/66783 A1 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY) 13.09.2001, pág. 20, líneas 4 a 8.	1

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos ☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T"	documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&"	documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.		
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.		

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.

16 Junio 2004 (16.06.2004)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.

01 JUL 2004 01.07.2004

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional

O.E.P.M.

Funcionario autorizado

A. Maquedano Herrero

C/Panamá 1, 28071 Madrid, España.

N° de fax 34 91 3495304

N° de teléfono + 34 91 3495474

Formulario PCT/ISA/210 (segunda hoja) (Enero 2004)

Not Available Copy

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES 2004/000140

C (Continuación).

DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
A	SU 1822876 A1 (GRIPPE INST. et al.) 23.06.1993 (resumen) World Patent Index [en línea]. Londres (Reino Unido): Derwent Publications, Ltd. [recuperado el 14.06.2004]. Recuperado de EPOQUENET, E.P.O., DW199443, N° de acceso 1994-348855.	1

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional n°

PCT/ ES 2004/000140

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
EP 0702081 A	20.03.1996	EP 19950114741 JP 8089239 A JP 2858087 B US 6051425 A US 6300128 B EP 1361265 A EP 20030015613	19.09.1995 09.04.1996 17.02.1999 18.04.2000 09.10.2001 12.11.2003 19.09.1995
US 6194138 B	27.02.2001	DE 19735460 A EP 0898889 AB EP 19980114288 JP 11116490 A AT 252826 T DE 59810005 D PT 898889 T ES 2205342 T	18.02.1999 03.03.1999 30.07.1998 27.04.1999 15.11.2003 04.12.2003 31.03.2004 01.05.2004
WO 02074301 A	26.09.2002	CA 2440480 A EP 1379230 A EP 20020725226	26.09.2002 14.01.2004 15.03.2002
EP 1127580 A	29.08.2001	CA 2337616 A EP 20010301510 AU 2317201 A JP 2001261564 A US 2002009433 A HU 0100844 A ZA 200101488 A US 2004091527 A	23.08.2001 20.02.2001 30.08.2001 26.09.2001 24.01.2002 28.03.2002 21.08.2002 13.05.2004
WO 0166783 A	13.09.2001	AU 4122901 A KR 2001087681 A US 2003073735 A	17.09.2001 21.09.2001 17.04.2003
SU1822876 A	23.06.1993	NINGUNO	-----